



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2004-0025745
Application Number

출원 년 월 일 : 2004년 04월 14일
Date of Application APR 14, 2004

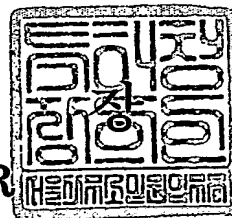
출원인 : 주식회사 글루칸
Applicant(s) GLUCAN, INC



2004 년 10 월 29 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.04.14
【발명의 명칭】	베타 -글루칸을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물
【발명의 영문명칭】	A composition containing beta-glucan for prevention and treatment of osteoporosis
【출원인】	
【명칭】	주식회사 글루칸
【출원인코드】	1-2002-021627-8
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】	2002-042446-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	신현동
【성명의 영문표기】	SHIN, Hyun Dong
【주민등록번호】	650712-1675617
【우편번호】	701-480
【주소】	대구광역시 동구 지묘동 360번지 태왕그린힐즈 106동 106호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	손미경
【성명의 영문표기】	SON, Mi Kyung
【주민등록번호】	790321-2691426
【우편번호】	702-022
【주소】	대구광역시 북구 복현2동 복현우방아파트 105동 1302호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박복련
【성명의 영문표기】	PARK, Bok Ryun
【주민등록번호】	671022-2122225

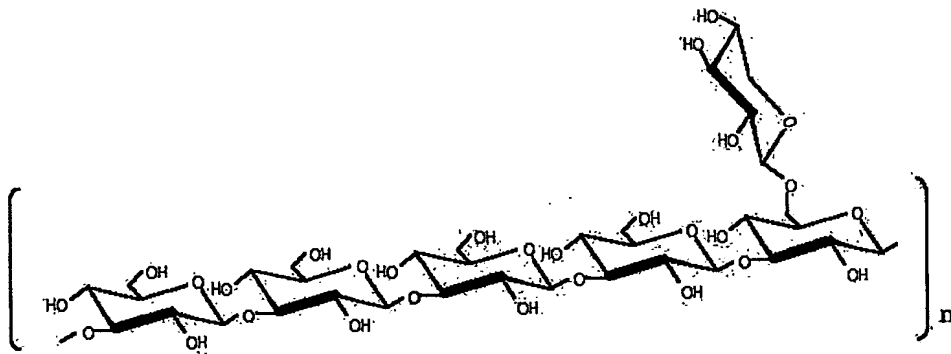
【우편번호】	614-763
【주소】	부산광역시 부산진구 전포2동 서면한신아파트 101동 1101호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	손창우
【성명의 영문표기】	SON, Chang Woo
【주민등록번호】	760728-1182413
【우편번호】	616-786
【주소】	부산광역시 북구 화명동 화명대림타운 409동 1703호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	장희정
【성명의 영문표기】	JANG, Hee Jeong
【주민등록번호】	780716-2117829
【우편번호】	604-831
【주소】	부산광역시 사하구 당리동 352-2 대원연립 A동 107호
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이덕록 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	0 면 38,000 원
【가산출원료】	23 면 0 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	3 항 205,000 원
【합계】	243,000 원
【감면사유】	소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】	72,900 원
【첨부서류】	1. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 본 발명은 베타 글루칸을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 베타 글루칸은 바람직하게는 젖산을 치환기로 갖는 하기 화학식 1의 베타-1,3/1,6 글루칸이며, 상기 젖산을 치환기로 갖는 베타-1,3/1,6 글루칸은 바람직하게는 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 (KCCM 10307)로부터 생산되는 것이다.

[화학식 1]



【대표도】

도 2

【색인어】

글루칸, 베타 글루칸, 베타-1,3/1,6-글루칸, 아우레오바시디움 플루란스, 골다공증, 파골세포, 조골세포

【명세서】**【발명의 명칭】**

베타-글루칸을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물 {A composition containing beta-glucan for prevention and treatment of osteoporosis}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 수용성 베타- 1,3/1,6-글루칸에 치환되어 있는 유기산의 종류를 분석한 박막액체크로마토그램을 나타낸 것이다.

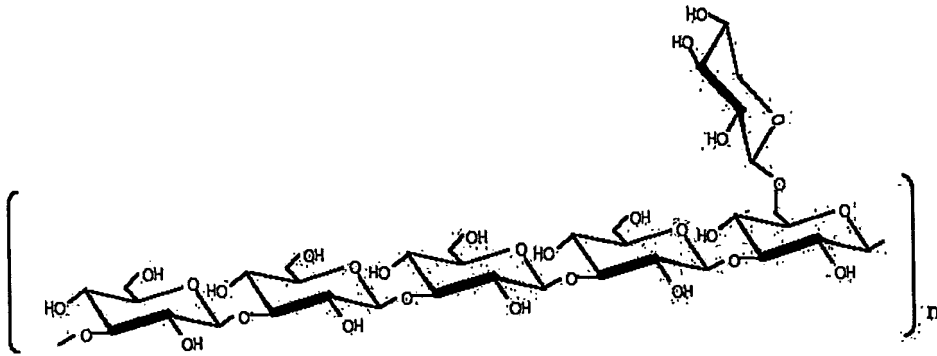
도 2는 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 수용성 베타- 1,3/1,6-글루칸의 파골세포 형성 저해 효과를 나타낸 사진이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<3> 본 발명은 베타 글루칸을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 베타 글루칸은 바람직하게는 젖산을 치환기로 갖는 하기 화학식 1의 베타-1,3/1,6 글루칸이며, 상기 젖산을 치환기로 갖는 베타-1,3/1,6 글루칸은 바람직하게는 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 (KCCM 10307)로부터 생산되는 것이다.

<4> [화학식 1]

<5>



<6> 골은 신체의 물리적 지지체로서 역할을 하며 또한 무기물 특히 칼슘과 인의 저장고로서의 역할 등을 수행한다. 골은 인과 칼슘이 주성분인 무기물과 타입 I 콜라겐 (type I collagen) 등이 주성분인 유기물 그리고 물로서 구성되어 있다. 골량은 생후 계속 증가하여 20세를 전후하여 최대 골량을 보이며 30세 이후 골의 감소가 지속적으로 일어난다. 특히 여성의 경우 50세를 전후로 폐경 후 약 5-10년간 에스트로겐의 결핍에 의한 급격한 골 소실이 일어나게 된다. 골강도는 크게 골밀도에 기인하며 뼈의 미세구조, 크기, 기하학 등도 영향을 미치게 된다. 골은 구조적으로 무기질이 침착된 결합조직으로 구성된 바깥층과 골수강내 골수가 들어있는 내부를 가진 장기이다. 또한, 골수는 조혈기능을 가지고 있고 골수의 조혈간세포(hematopoietic stem cell)는 골 흡수를 담당하는 파골세포로 분화하며 골수 기질세포(stromal cell)는 골 형성을 담당하는 조골세포로 분화된다 (Manolagas SC, Jilka RL: Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. N. Engl. J. Med. 332(5):305-11, 1995).

<7> 골다공증은 다발성 골수종, 골관절염, 고칼슘혈증 등의 골과 관련된 질병들 중 가장 근본적인 골격계 질환으로서 골절에 대한 감수성의 증가와 뼈의 강도의 감소를 나타낸다. 골은 항상 골아세포 (조골세포)에 의한 골의 형성과 파골세포에 의한 골의 파괴가 동시에 일어나며 정상적인 골의 기능을 위해 계속해서 재구축 과정이 일어나게 된다. 그러나, 골 흡수와 골 형성 간의 재구축 과정의 균형이 골 흡수 방향으로 치우치게 되면 파골세포에 의한 골 흡수가 증대되고

골량의 감소와 골 강도의 약화가 일어나 결국은 골절 위험이 증대된 골다공증이 유발되게 된다. 현재 적용되는 골다공증의 치료제는 크게 골흡수 억제제와 골형성 촉진제로 구분될 수 있다.

◀ 골 흡수 억제제로는 여성 호르몬, 비스포스포네이트 제제 (bisphosphonate), 선택성 난포호르몬 수용체 조절제, 칼시토닌 등이 있으며 골형성 촉진제로서는 부갑상선 호르몬 제제가 사용되며 이들 외에 활성형 비타민 D 등이 적용되고 있다. 하지만 강력한 골 흡수 억제제로서의 비스포스포네이트가 흡수율이 낮으며 위장관 등에 부작용이 있고 난포 호르몬 제제 역시 장기간 투여 시 유방 및 자궁암의 유발 가능성 등 현재 적용되는 치료제들의 단점들로 인하여 이를 개선하는 연구와 새로운 목표물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (David Goltzman,

Discoveries, Drugs and Skeletal Disorders, nature review 1, 784-796 (October 2002)).

◀ 골 재흡수(bone remodeling)의 기작은 2000년을 전후로 파골세포와 기질 및 골아 세포의 분화와 활성화에 필수적인 OPG (osteoprotegerin), RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand), RANK (receptor activator of nuclear factor κ B) 단백질이 동정 되고 역할이 규명되면서 기존의 골 대사에 영향을 미치는 난포호르몬과 부갑상선 호르몬과 같은 호르몬(hormone)들, 인터루킨-1 (interleukin-1, IL-1) 및 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)와 같은 사이토카인 (cytokine)류, 그리고 면역성장인자 (immune growth factor, IGF)와 같은 성장인자 (growth factor) 등의 작용 기전이 규명되고 이들 단백질을 목표로 한 연구도 진행되고 있다. 이들 외에도 파골세포의 골에 대한 유착 및 활성화에 영향을 미치는 단백질들과 신호전달 기작 및 전사인자 (AP1, c-src)들에 대한 연구와 다양한 성장인자들 (TGF- β , PDGF, FGF), 지질 조절인자들(PPAR γ 등) 등 많은 목표 물질에 대해 연구가 진행 되고 있다 (JH

Tobias, AM Flanagan, AM Scutt: Novel therapeutic targets in osteoporosis. Expert Opin. Ther. Targets 6(1):41-56, 2002).

- 10> 한편, 현재 골다공증의 치료제로서 골 흡수 저해제가 아닌 골 형성 촉진제로 미국식품의약국의 승인을 받은 것은 최근 승인된 부갑상선 호르몬제가 유일하다. 현재 대부분의 골다공증 치료에 적용되는 골 흡수 저해제는 골 전환율 (bone turnover)를 저하시킴으로써 효과를 나타내는데, 이미 골 소실이 많이 진행된 경우나 골 전환율이 높은 환자의 경우 또는 단기적이 아닌 장기적인 면의 골절 예방을 고려할 때 골 형성 촉진제의 필요성이 높아지고 있다. 이에 기존의 불소 화합물 및 부갑상선 호르몬 외에도 골 형성을 담당하는 조골세포를 목표로 한 연구가 많이 진행되고 있다 (임승길, 골다공증 치료제로서 Bone Formation-Stimulating Agent, 대한내분비학회지 14권 2호, 1999).
- 11> 최근 자가면역성 관절염 (autoimmune arthritis) 그리고 골다공증 등이 인체의 면역활성 조절에 중요한 역할을 하는 각종 사이토카인들의 불균형과 밀접한 관계가 있음이 밝혀졌다. 예로써 파골세포의 분화와 활성을 조절하는 OPG, RANK, RANKL은 면역세포들의 분화와 생성을 조절하는데 필수적인 인자들이며 활성화된 T세포에 의한 RANKL은 파골세포의 생성을 유도하고 골 파괴를 유도하게 된다. 이와 같이 면역계와 뼈 신진대사가 유전적인 기능적으로 연관되어 있음이 증명되었으며 면역조절기능의 정상화를 통한 새로운 개념의 골다공증의 예방 및 치료제 개발이 많은 관심을 끌고 있다 (공영운 Osteoprotegerin ligand : 면역반응과 골 생리의 조절인자, Biowave vol. 4 No.5, 2002). 그리고 특히, 에스트로젠과 같이 독성 및 부작용을 가진 기존의 호르몬 및 화학합성 유기화합물 치료제를 대체할 신물질의 개발이 절실히 요구되고 있다. 따라서 이러한 신물질은 천연물에서 발견될 가능성이 매우 높기 때문에 천연물로부터 신약을 창출하려는 시도가 활발히 진행되고 있다.

- <12> 본 발명자들은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 인식하고, 골밀도를 저하시키는 파골세포의 활성을 현저히 저해시킴과 동시에 뼈의 생성을 촉진하는 조골세포를 크게 활성화시키는 생리활성을 갖고 있는 천연 물질을 탐색하던 중, 종래 면역증진 효과 및 항암 효과로 알려져 있는 베타-글루칸을, 골다공증 치료 용도로 이용하는 것에 착안하게 되었다.

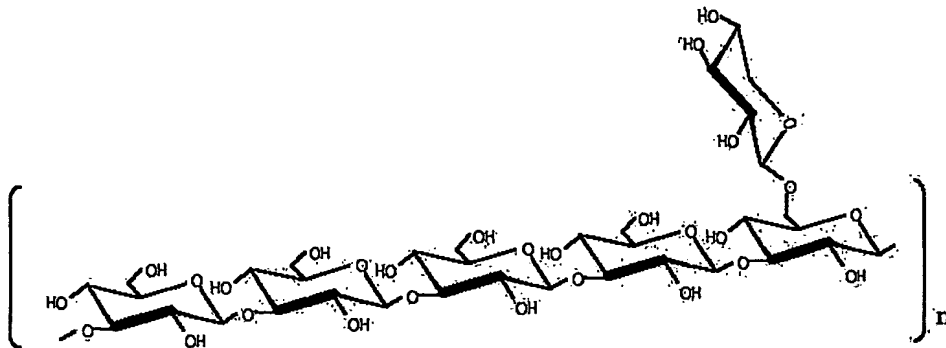
【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <13> 본 발명의 목적은 골 흡수 저해 또는 골 형성 촉진 작용을 나타내는 새로운 생리활성물질을 탐색하고, 이를 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- <14> 상기와 같은 본 발명의 기술적 과제는, 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 (KCCM 10307)의 배양 상등액으로부터 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸 (acidic β -1,3/1,6- glucan)을 제조하고 그 구조적 특징을 조사한 다음 상기 물질이 파골세포 형성과 조골세포 활성화에 미치는 영향을 조사하고, 상기 베타-글루칸 외에 효모 유래의 베타-글루칸, 푸스툴란 (pustulan), 영지버섯 및 치마버섯 유래의 베타-글루칸이 파골세포 형성과 조골세포 활성화에 미치는 영향도 조사하여, 베타-글루칸의 골다공증 예방 및 치료 효과를 확인함으로써 달성하게 되었다.

【발명의 구성 및 작용】

- <15> 본 발명은 베타 글루칸을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 베타 글루칸은 바람직하게는 젖산을 치환기로 갖는 하기 화학식 1의 베타-1,3/1,6 글루칸이며, 상기 젖산을 치환기로 갖는 베타-1,3/1,6 글루칸은 바람직하게는 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 (KCCM 10307)로부터 생산되는 것이다.

<16> 【화학식 1】



<17> 베타-글루칸은 파골세포의 활성 저해 효과가 있어 골다공증의 예방 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있으며, 특히 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 (KCCM 10307) 균주가 생산하는 베타-1,3/1,6-글루칸은 젖산기 (lactic acid group)가 치환되어 있어 물에 용이하게 용해되는 수용성의 산성 다당류로 인체의 골 대사에서 뼈속의 칼슘을 흡수하여 골밀도를 저하시키는 파골세포의 활성을 현저히 저해시킴과 동시에 뼈의 생성을 촉진하는 조골세포를 크게 활성화시키는 생리활성을 갖고 있어 골다공증의 예방 및 치료에 더욱 효과적으로 이용될 수 있다.

<18> 본 발명에서는 본 출원인이 대한민국 특허출원 제10-2001-0071242호에서 출원한 바 있는 특허균주 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 (KCCM 10307)을 탄소원과 질소원, 무기염류를 포함하는 배지에 3 내지 5%(v/v)로 접종하고, 25℃ 에서 200 rpm으로 호기적인 조건에서 3일간 배양하여 수용성의 베타-1,3/1,6-글루칸을 생산하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 제거하고 에탄올을 2배 부피로 첨가, 혼합하여 생산된 베타-1,3/1,6-글루칸을 침전시켜 회수한 후 동결 건조하여 분리·정제하였다.

<19> 상기와 같이 얻은 베타-1,3/1,6-글루칸은 베타글루카나제 (β -1,3-glucanase) 처리, 수산화나트륨 처리 후 생성된 당의 종류를 분석 정량하고 박막액체크로마토그래피 (thin layer liquid chromatography)와 고압액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatography)

로 분석함으로써 베타-1,3/1,6-글루칸의 분지도와 당쇄사슬에 치환된 유기산의 종류를 조사하여 젖산이 치환기로 존재함을 확인하고 또한 산성형의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸임을 증명하였다.

<20> 상기와 같이 얻은 베타-1,3/1,6-글루칸이 마우스 유래의 파골세포 형성에 미치는 영향과 뼈의 생성을 촉진하는 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과 아우레오바시디움 폴루란스 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸은 골 흡수를 하는 파골세포의 형성을 현저히 저해시키는 것과 동시에 골 형성을 촉진하는 조골세포의 활성을 크게 향상시키는 것을 확인하였다. 이상의 결과로서, 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸을 골다공증 예방 및 치료 용도로서 제공하게 되었다.

<21> 또한 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 베타-글루칸 외에, 효모 유래의 베타-글루칸, 푸스툴란 (pustulan), 영지버섯 및 치마버섯 유래의 베타-글루칸이 파골세포 형성과 조골세포 활성화에 미치는 영향도 조사하였으며, 그 결과 모든 베타-글루칸이 파골세포의 형성을 저해시키는 것을 확인하였다. 이상의 결과로서 베타-글루칸을 골다공증 예방 및 치료 용도로서 제공하게 되었다.

<22> 본 발명에서, 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 포함되는 베타-글루칸, 바람직하게는 화학식 1의 베타-글루칸, 또한 바람직하게는 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001에서 생산되는 베타-글루칸의 유효 함량은 5~900 mg/kg, 바람직하게는 20~200 mg/kg이다.

<23> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 아래 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 아래 실시예에 한정되는 것은 아니다.

- 24> 실시예 1 : 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸 제조
- 25> 본 발명에서 골다공증 예방 및 치료용 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸을 제조하기 위한 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001의 배양배지는 5g/L의 K_2HPO_4 , 1g/L의 NaCl, 0.2g/L의 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.6g/L의 $(NH_4)_2SO_4$ 및 2.5g/L의 효모 추출물이 포함된 것을 사용하였다. 탄소원으로 포도당을 멸균한 후, 멸균된 배지에 무균적으로 2%(v/v)으로 혼합하여 사용하였다. 전 배양은 고체배지에서 일정시간 배양한 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001를 한 백금니 취하여 250ml용량의 플라스크에 멸균하여 준비된 50ml의 배지에 접종한 후, 30℃에서 180rpm의 진탕 속도로 72시간 진탕 배양하였다. 본 배양은 전배양한 배양액을 500ml용량의 플라스크에 멸균되어 준비된 150ml의 동일 배지에 5% (v/v)를 접종하여 전 배양과 동일한 방법으로 3일간 배양하였다.
- 26> 상기 배양액을 8000×g의 범위에서 20분간 원심분리하고 균체를 제거한 상등액을 회수하였다. 전기 회수한 상등액에 2배 용량의 95% 에탄올을 첨가하고, 잘 혼합하여 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였다. 이 용액을 8000×g의 범위에서 20분간 원심분리하고 상등액을 제거한 후, 침전물을 95% 에탄올로 2회 세척하였다. 세척한 침전물을 적당한 양의 증류수에 용해시킨 다음, 2일 동안에 5회 증류수를 바꿔 주면서 투석하여 염 성분을 포함한 저분자 물질을 제거하였다. 투석막은 배제 분자량이 13,000 달톤 (dalton)인 것을 사용하였으며, 상기 투석 내부 분획을 진공 동결 건조하여 회수함으로써 배양액 1리터 (liter) 당 약 3g의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸 분말을 제조하였다.
- 27> 실시예 2 : 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸의 분지도 및 치환 유기산 분석

<28> 실시예 1에서 제조된 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸의 분지도를 분석하기 위하여, 1.0%(w/v)의 농도로 베타-1,3/1,6-글루칸이 용해된 초산완충용액 (pH 4.0)에 엔도 베타-1,3-글루카나제 (endo- β -1,3-glucanase from *Rhizoctonia solani*, Sigma Co.) 50 mg을 첨가하여 용해시킨 후 40℃에서 2시간 동안 반응시키면서 반응 생성물인 포도당 (glucose)와 포도당이 베타-1,6-글루코사이드 결합으로 연결된 젠티바이오즈 (gentibiose)의 생성량을 환원당 및 포도당 정량법을 이용하여 분석하였다.

<29> 그 결과, 표 1에서 보는 바와 같이 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸은 반응 한 시간 후에는 가수분해율이 42.5%로 평형상태에 도달하였으며, 생성된 젠티바이오즈와 포도당의 생성 몰비는 평균 4:1로 베타-1,3 결합으로 연결된 포도당 5 분자당 베타-1,6 결합을 하고 있는 젠티바이오즈가 1 분자씩 연결된 분지형의 베타-글루칸임을 알 수 있었다.

<30> 【표 1】

엔도 베타-1,3-글루카나제를 이용하여 베타-1,3/1,6-글루칸을 가수분해하는 과정에서 생성된 젠티바이오즈와 포도당의 생성 몰비

반응시간(분)	가수분해율(%)	포도당/젠티바이오즈(molar ratio)
10	15.8	2.58
30	19.5	3.55
60	42.5	4.05
90	42.8	5.86

<31> 또한 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸에 치환되어 있는 유기산의 종류를 조사하고자, 제조된 베타-1,3/1,6-글루칸을 0.1 M 수산화나트륨 용액에 용해시킨 후 70℃에서 2시간 동안 교반하면서 치환된 유기산을 분리하였다. 반응 후 반응액에 에탄올을 2배 부피로 첨가하여 베타-글루칸을 침전시켜 제거한 후 수산화나트륨을 제거하기 위하여 강 음이온성 이온교환수지인 Dowex 50W-X8에 흡착시켰다. 그리고 유기산이 함유된 비흡착 용

출용액을 양이온성 이온교환수지인 DEAE-Sephadex에 흡착시킨 후 4 N 개미산으로 유기산 성분을 용출하였다. 용출된 유기산 성분은 진공건조한 후 증류수에 용해하여 전개용매로 1-부탄올/피리딘/물 (1-butanol/pyridine/water, 6/4/3) 혼합용액을 사용하여 박막액체크로마토그래피로 유기산 성분을 분리, 전개한 후 발색시약 (0.5%(w/v) bromophenol blue 에탄올 용액)을 이용하여 발색시켜 유기산의 종류를 확인하였다.

<32> 그 결과 도 1에서 보는 바와 같이 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸에 치환되어 있는 유기산의 종류는 젖산 (lactic acid)으로 확인되었다. 이상의 결과를 종합하면 본 발명의 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸은 도 2와 같은 구조의 수용성이며 분지된 구조를 갖는 산성형 베타-1,3/1,6-글루칸이다.

<33> 실시예 3 : 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸의 파골세포 형성 저해 효과

<34> 1) 마우스 조골세포 분리

<35> ICR 마우스 1일령을 에탄올에 담그고 수술용 가위와 핀셋을 이용하여 무균적으로 두개골을 절취하였다. 모아진 두개골의 근육과 이물질을 멸균된 α -최소 기본 배지 (α -minimum essential medium, α -MEM)에서 제거한 후 0.2% 콜라겐분해효소 (Gibco BRL)를 10ml 첨가하였다. 이것을 37℃에서 약 20분간 200 rpm에서 처리하여 처음 획득된 조골세포는 버리고 2회부터 5회까지 같은 방법으로 반응 상등액을 취하였다. 수집된 상등액에 PBS (phosphate buffered saline) 완충용액을 첨가한 후 1,200 rpm 에서 약 5분간 원심분리 하였다. 모아진 조골세포를 10% FBS

(fetal bovine serum)가 포함된 α -MEM배지를 첨가하여 배양하였으며 2-3일 후 조골세포의 활성 실험에 적용하거나 조골세포를 회수하여 냉동 보관 후 파골세포 형성 억제 실험에 적용하였다.

<36> 2) 골수세포의 준비

<37> 6주령 ddy 마우스의 경추를 탈골한 후 무균적으로 마우스의 경골 및 대퇴골을 적출하고 이물질을 제거하였다. 주사기를 이용하여 상기 골 내에 α -MEM을 분주하여 골수세포를 획득하였다. 획득한 골수세포를 상기 주사기를 이용하여 뭉쳐진 세포를 떨어뜨린 후 1,200 rpm에서 약 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 적혈구 파괴를 위해 트리스-염산 완충용액 (0.8% 염화암모늄, pH 7.5)을 5ml 첨가한 후 충분히 혼합하고 같은 조건에서 원심분리하여 골수세포만을 얻었다.

<38> 3) 시료의 준비

<39> 상기 실시예 1에서 제조한 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸을 2.5×10^{-3} g/ml의 농도로 증류수 또는 DMSO (dimethylsulfoxide)에 녹인 후 0.25 μ m 필터 (filter)를 이용하여 여과하였다. 이 용액을 2×10^{-6} g/ml, 2×10^{-8} , 그리고 2×10^{-7} 농도로 10% FBS용액이 첨가된 α -MEM 분화 배지로 희석한 후 실험에 사용하였다. 분화 배지는 활성인자인 1,25-디하이드록시-비타민 D₃ (1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ : 10ng/ml)와 덱사메타손 (dexamethasone : 0.1 μ M)을 α -MEM에 첨가하여 완성하였다.

<40> 4) 공존 배양 및 파골세포 형성 저해 실험

<41> 상기 1)에서의 조골세포를 5×10^{-3} /50 μ l α -MEM이 되도록 희석한 후 96 well plate에 분주한 후 상기 2)에서 얻은 골수세포를 5×10^{-5} /50 μ l α -MEM의 농도로 희석한 후 96 well plate에 첨

가하였다. 다음으로 상기 3)에서 제조된 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸 시료 및 분화인자 용액을 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하였으며 매 2일 마다 $100\mu\text{l}$ 의 배지 및 용액을 버리고 $100\mu\text{l}$ 를 새로 첨가하였다. 배양 6일 후 성숙한 파골세포가 현미경 상에서 보이면 배양액을 제거하고 PBS로 수세하였다. 이를 다시 10% 포르말린을 첨가하여 고정한 후 다시 PBS로 수세 후 건조하였다. 성숙한 파골세포의 수를 측정하기 위해 파골세포의 표지효소인 TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase, 이하 "TRAP"라 약칭한다) 염색액을 $100\mu\text{l}$ 첨가한 후 10분간 반응시켰다. 염색 확인 후 염색액을 버리고 PBS로 수세한 후 TRAP에 염색된 10개 이상의 핵을 가진 성숙한 파골세포의 수를 측정하였다.

<42> 5) 결과 분석

<43> 파골세포 형성 저해 정도의 측정은 상기 4)에서 측정된 성숙한 파골세포의 수를 대조군과 비교하여 % 저해 정도로 나타내었으며 시료물질의 각 농도별로 $n=5$ 개 이상을 두었으며 파골세포 형성 저해 실험을 3회 이상 반복 실시하였으며 그 결과를 도 3과 표 2에 제시하였다.

<44> 【표 2】

아우레오바시디움 플루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸의 파골세포 형성 저해 효과

베타-글루칸 농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)	파골 세포수(개)	파골세포 형성 저해율(%)
50	0.0	100.0
25	0.4 \pm 0.9	99.6 \pm 1.0
5	20.7 \pm 5.7	79.2 \pm 6.2
0.5	77.3 \pm 6.7	14.2 \pm 7.3
대조군	91.3 \pm 9.7	

비고) IC50 : 0.92 $\mu\text{g}/\text{ml}$

<45> 상기 도 3과 표 2에서 보는 바와 같이 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 유래의 수용성 산성형 베타-1,3/1,6-글루칸은 대조군이 91.3 \pm 9.7 개의 파골세포를 형성하였으나 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 완전히 파골세포로의 분화를 저해함을 확인하였으며 이는 파골세포의 형성을 억제함으로써 골 흡수를 억제하여 골다공증의 치료와 예방에 효과가 있을 것으로 판단된다.

46> 실시예 4 : 베타-글루칸의 종류에 따른 파골세포 형성 저해 효과

47> 상기 실시예 3에서 보는 바와 같이 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 유래의 베타-글루칸은 파골세포 저해효과가 매우 큰 것으로 나타났다. 이에 베타-글루칸의 종류에 따른 파골세포 형성 저해효과를 조사하고자, 실시예 3에서와 동일한 방법으로 SM2001 균주 유래의 베타-글루칸 외에 효모 유래의 베타-글루칸, 푸스툴란 (pustulan), 영지버섯 및 치마버섯 유래의 베타-글루칸을 시료로 사용하여 각각의 파골세포 형성저해 효과를 조사하고 그 결과를 표 3에 나타내었다.

48> 【표 3】

베타-글루칸의 종류에 따른 파골세포 형성 저해 효과

농도	파골세포 형성 저해능 (%)				
	SM2001 베타-글루칸	효모 베타-글루칸	푸스툴란	영지버섯 베타-글루칸	치마버섯 베타-글루칸
1×10^{-6}	60.5 \pm 2.0	34.7 \pm 5.0	27.6 \pm 2.0	34.7 \pm 1.6	21.3 \pm 6.7
1×10^{-7}	35.1 \pm 7.6	9.2 \pm 0.9	6.1 \pm 0.7	29.0 \pm 3.4	31.2 \pm 4.5

49> 상기 표 3에서 보는 바와 같이 대부분의 베타-글루칸이 파골세포형성 저해효과가 있었으며 특히, 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 유래의 수용성 산성형 베타-1,3/1,6-글루칸이 가장 높은 파골세포형성 저해효과를 보였다.

50> 실시예 5 : 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸의 조골세포 형성 촉진 효과

51> 골다공증의 예방 및 치료 물질로서 효용가치를 조사하기 위해서는 골 흡수제가 아닌 골 형성 촉진제로서 기능성을 조사할 필요가 있다. 이에 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 유래

의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸이 골 형성 촉진에 핵심역할을 하는 조골세포 형성 촉진에 미치는 영향을 조사하였다.

<52> 1) 조골세포의 준비

<53> 실시예 1의 1)에서와 동일한 방법으로 마우스 조골세포를 준비한다. 준비된 조골세포를 10% FBS가 포함된 α -MEM 2ml에 5×10^{-5} 세포/well 이 되도록 12 well plate에 분주한다. 37℃에서 24시간 배양 후 배지를 완전히 제거하고 약물을 첨가하였다.

<54> 2) 시료의 준비 및 염색액의 제조

<55> 조골세포 분화배지는 10% FBS가 포함된 α -MEM에 조골세포 분화 및 활성인자인 아스코브르산 (ascorbic acid : 0.1mg/ml)와 베타-글리세르인산 (β - glycerolphosphate : 5mM)을 첨가하여 혼합하였다. 상기 분화 배지를 이용하여 2.5×10^{-3} g/ml된 베타-1,3/1,6-글루칸 시료를 1×10^{-5} 및 1×10^{-7} g/ml의 농도로 시료를 희석하였다.

<56> AR-S 염색액 (40mM Alizarin)의 제조를 위해서 시그마사의 Alizarin Red S 136.8mg을 물 10ml에 녹인 후 0.25 μ m 필터를 이용하여 여과하였다. Vonkossa (5% silver nitrate) 염색을 위해서 질산은 5g을 초순수에 녹여 최종 부피가 100ml이 되게 하여 5%(w/v)의 질산은 염색액을 만들었다. AR-S의 용출 실험에 필요한 cetylpyrinidinium chloride 용액은 10%(w/v) 농도로 10mM 인산나트륨 완충용액 (pH7.0) 용액에 용해시켜 제조하였다. AR-s 표준용액은 40mM AR-S 73 μ l와 10% cetylpyrinidinium chloride 용액 927 μ l를 섞어 1mg/ml의 농도로 만든 후 다양한 농도로 희석하여 사용하였다.

<57> 3) 조골세포 활성 실험

- 58> 준비된 시료를 상기 1)의 plate에 매 3일 마다 배지를 완전히 제거한 후 다시 첨가하였다.
- 배양 후 15일이 되면 배지를 완전히 제거하고 정제수로 수 회 수세한 후 10% 포르말린 수용액을 각 well에 1 ml을 첨가하여 30분간 고정하였다. 고정 후 물로 1회 수세한 후 상기에서 제조된 Alizarin Red S (40mM Alizarin Red S) 염색액 또는 Vonkossa' (5% 질산은) 염색액을 500 μ l씩 첨가하여 30분간 반응 시킨 다음 물로 수회 수세하고 건조하였다.
- 59> 4) 결과분석
- 60> 상기 염색을 통해 인 또는 칼슘의 적립된 양을 면적을 계산하거나 AR-S의 경우 염색액을 추출하여 흡광도로도 측정할 수 있었다. 면적의 측정은 염색된 면적을 이미지 분석기 (Image analyzer, Laica Co.)를 통해 염색된 면적을 측정하여 대조군에 대한 면적대비 퍼센트(%)로 나타내었다. 또한, AR-S 염색법은 칼슘의 축적량의 경우 면적의 산출은 상기와 상동하며 염색액 중의 AR-S 용출을 통한 흡광도로서도 측정이 가능하다. 염색된 plate에서 AR-S를 용출하기 위하여 10% cetylpyrinidinium chloride 용액을 500 μ l씩 첨가한 후 37℃에서 2시간 반응시켰다. 용출된 AR-S 용액의 흡광도는 560nm에서 측정하며 AR-S 용액의 농도별 흡광도를 측정하여 작성한 표준그래프를 이용하여 정확한 용출된 AR-S의 양을 계산하였다.

61> 【표 4】

시료	1x10 ⁻⁵ (g/ml)		1x10 ⁻⁷ (g/ml)	
	AR-S양(μ g/ml)	조골세포 활성(%)	AR-S양(μ g/ml)	조골세포 활성(%)
베타-글루칸	335.38	115	390.38	183
대조군	291.25.6	100	213.64.1	100

- 62> 표 4에서 보는 바와 같이 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸이 대조군에 비해서 조골세포 형성 촉진 효과가 높음을 알 수 있다. 이는 아우레오바시디

움 폴루란스 SM2001 유래의 수용성 베타-1,3/1,6-글루칸이 조골세포의 칼슘의 축적을 통한 골의 형성에도 효과 있음을 보여주는 결과이다.

<63> 실시예 6 : 베타-글루칸의 종류에 따른 조골세포 형성 촉진 효과

<64> 상기 실시예 5에서 보는 바와 같이 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 베타-글루칸은 조골세포 형성 촉진효과가 큰 것으로 나타났다. 이에 베타-글루칸의 종류에 따른 조골세포 형성 촉진효과를 조사하고자, 실시예 5에서와 동일한 방법으로 SM2001 균주 유래의 베타-글루칸 외에 효모 유래의 베타-글루칸, 푸스툴란 (pustulan), 영지버섯 및 치마버섯 유래의 베타-글루칸을 시료로 사용하여 조골세포 형성 촉진효과를 조사하고 그 결과를 표 5에 나타내었다.

<65> 【표 5】

베타-글루칸의 종류에 따른 조골세포 형성 촉진효과

농도(g/ml)	조골세포 형성 촉진 효과(%) (AR-S 용출량; $\mu\text{g/ml}$)					
	대조군	SM2001 베타-글루칸	효모 베타-글루칸	푸스툴란	영지버섯 베타-글루칸	치마버섯 베타-글루칸
1×10^{-5}	291 \pm 25	335 \pm 35	160 \pm 27	122 \pm 18	151 \pm 34	122 \pm 36

<66> 상기 표 5에서 보는 바와 같이 대부분의 베타-글루칸이 조골세포 형성 촉진효과가 없었으나, 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 수용성 산성형 베타-1,3/1,6-글루칸은 조골세포의 칼슘의 축적을 통한 높은 조골세포 형성 촉진효과를 보였다. 즉, 아우레오바시디움 폴루란스 SM2001 유래의 베타-1,3/1,6-글루칸은, 파골세포의 분화 억제 및 형성 저해 효과 뿐만 아니라 조골세포의 형성 촉진 효과도 있어, 골다공증 치료제 및 예방제로서의 적용 가능성이 매우 높음을 확인할 수 있다.

【발명의 효과】

<67> 상술한 바와 같이, 베타-글루칸은 파골세포의 활성 저해 효과가 있어 골다공증의 예방 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있으며, 특히 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 (KCCM 10307) 균주가 생산하는 베타-1,3/1,6-글루칸은 젖산기 (lactic acid group)가 치환되어 있어 물에 용이하게 용해되는 수용성의 산성 다당류로 인체의 골 대사에서 뼈속의 칼슘을 흡수하여 골밀도를 저하시키는 파골세포의 활성을 현저히 저해시킴과 동시에 뼈의 생성을 촉진하는 조골세포를 크게 활성화시키는 생리활성을 갖고 있어 골다공증의 예방 및 치료에 더욱 효과적으로 이용될 수 있다. 또한 상기 수용성 산성형 베타-1,3/1,6-글루칸은 아우레오바시디움 플루란스 SM2001의 대량배양을 통한 경제적 생산이 가능하고 인체에 대한 안정성이 확보된 천연물질이며 본 물질이 갖고 있는 인체의 면역 증강 효과 등의 부가적 효과도 기대할 수 있으므로 이는 건강식품 및 의약 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

【특허청구범위】

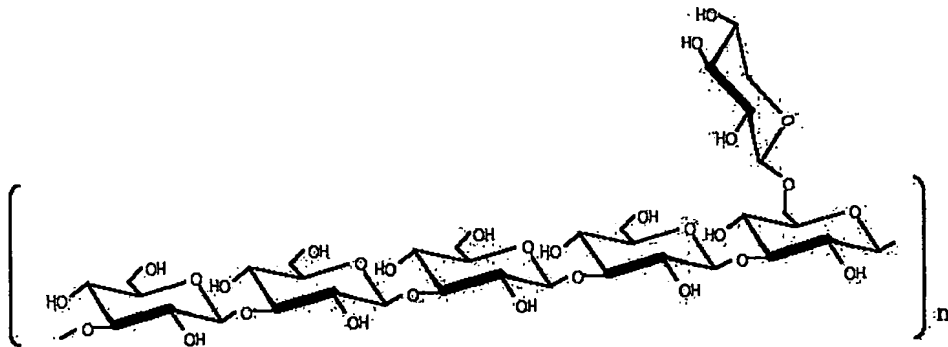
【청구항 1】

베타 글루칸을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 젖산을 치환기로 갖는 하기 화학식 1의 베타-1,3/1,6 글루칸을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물.

[화학식 1]



【청구항 3】

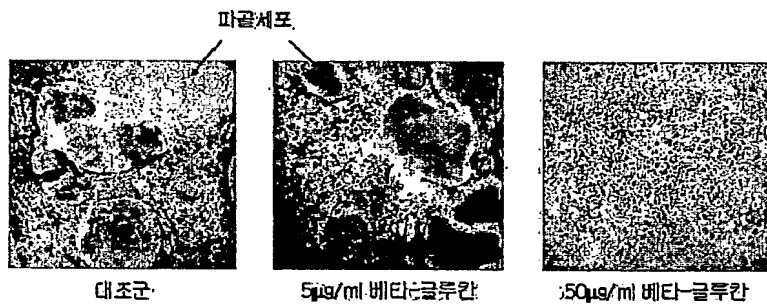
제 2항에 있어서, 아우레오바시디움 플루란스 SM2001 (KCCM 10307)이 생산하는 베타-1,3/1,6-글루칸을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물.

【도면】

【도 1】



【도 2】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.